



IFU-MPK03-EL
Έκδοση 11
Τελευταία αναθεώρηση: 2022/08

MucoPAP-F

Κιτ τεστ PAP για τον νεογνικό έλεγχο για κυστική ίνωση

Πατέντα INSERM

Χρονικά διαλυμένη φθοριοανοσολογική ανάλυση
Οδηγίες χρήσης και αντιδραστήρια για 96 δοκιμασίες

Κατασκευάζεται από :

DYNABIO S.A.

Luminy Biotech Entreprises

Case 922 - 163, avenue de Luminy

13288 Marseille cedex 9

FRANCE

Τηλ: +33 (0)4 86 94 85 04

www.dynabio.eu

REF MPK03

IVD

CE

ΣΥΜΒΟΛΑ



Για *in vitro* διαγνωστική χρήση



Αριθμός παρτίδας



Αριθμός καταλόγου



Ημερομηνία λήξης (yyyy/mm/dd)



Αποθήκευση μεταξύ +2°C και +8°C



Περιέχει αντιδραστήρια για 96 δοκιμές



Σημείωση: Διαβάστε τις οδηγίες χρήσης



Κατασκευαστής

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΣΟΛΟΓΙΑΣ	4
ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ ΚΑΙ ΕΙΝΑΙ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΑ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΣΟΛΟΓΙΑ	4
ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΚΙΤ	5
ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ	6
ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	6
ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ	7
ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ.....	7
ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΩΝ	7
ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ	8
ΤΗΝ ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΣΟΛΟΓΙΑΣ	8
ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	9
Βαθμονόμηση	9
Ποιοτικός έλεγχος	10
Ανάλυση των αποτελεσμάτων των νεογνικών δειγμάτων	10
ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΔΟΣΟΛΟΓΙΑΣ	10
ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	10
ΑΠΟΛΟΣΗ.....	10
ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	11
ΕΓΓΥΗΣΗ	12
ΑΝΑΦΟΡΕΣ	13
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΗΣ ΔΟΣΟΛΟΓΙΑΣ	13

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η πρωτεΐνη που σχετίζεται με την παγκρεατίτιδα (PAP, επίσης γνωστή ως Reg3A) συντίθεται από το πάγκρεας κατά τη διάρκεια της παγκρεατικής νόσου. Στην κυστική ίνωση, το πάγκρεας έχει ήδη προσβληθεί στη μήτρα και παράγει PAP. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η συγκέντρωση του PAP είναι αυξημένη στο αίμα των προσβεβλημένων νεογνών (1, 2, 3, 4, 5).

Η ανάλυση PAP στις βαθμονομημένες κάρτες διαλογής μπορεί επομένως να εντοπίσει τα νεογέννητα που είναι πιθανό να έχουν κυστική ίνωση.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΣΟΛΟΓΙΑΣ

Το kit MucosPAP-F προορίζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της PAP σε δείγματα αίματος νεογνών που κατατίθενται σε βαθμονομημένες και εγκεκριμένες κάρτες διαλογής. Πρόκειται για ανοσοδοκιμασία σάντουιτς που χρησιμοποιεί την τεχνική φθορισμού με χρονική ανάλυση (TRF). Το εύρος αναφοράς της ανάλυσης και οι εσωτερικοί έλεγχοι παρουσιάζονται ως κηλίδες αίματος σε βαθμονομημένες κάρτες διαλογής, όπως και τα προς εξέταση δείγματα.

Τα φρεάτια της πλάκας μικροτιτλοδότησης επικαλύπτονται με αντισώματα κατά του ΠΑΠ. Τα εκχυλίσματα των κηλίδων αίματος εναποτίθενται στα φρεάτια και το PAP που περιέχεται σε αυτά συνδέεται με τα ειδικά αντισώματα. Οι πρωτεΐνες που δεν δεσμεύονται απομακρύνονται με πλύση. Στη συνέχεια, προστίθενται αντισώματα αντι-PAP σημασμένα με βιοτίνη στα φρεάτια και προσδένονται στον ακινητοποιημένο PAP. Μετά την πλύση, το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος ανιχνεύεται με ένα σύμπλοκο στρεπταβιδίνης-ευρώπιου. Μετά από ένα περαιτέρω βήμα πλύσης, η προσθήκη διαλύματος ανάπτυξης φθορισμού προκαλεί τη διάσπαση του δεσμού μεταξύ στρεπταβιδίνης και ευρώπιου και τη δέσμευση του απελευθερωμένου ευρώπιου σε χηλικές ενώσεις με έντονο φθορισμό. Αυτά τα χηλικά άλατα εκπέμπουν στα 620 nm μετά από διέγερση στα 337 nm. Η ένταση του φθορισμού που εκπέμπεται είναι ανάλογη της ποσότητας PAP που περιέχεται στο αρχικό εκλουστικό διάλυμα.

ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ ΚΑΙ ΕΙΝΑΙ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΑ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΣΟΛΟΓΙΑ

Υλικό:

- Αναδευτήρας Vortex
- Αναδευτήρας πλακών (τροχιακός / 300 rpm = περιστροφές ανά λεπτό)
- Πλυντήριο πιάτων (αυτόματο ή ημιαυτόματο)
- Φασματοφθορόμετρο για μικροπλάκες, εξοπλισμένο με φίλτρο 337 nm για διέγερση και φίλτρο 620 nm για εκπομπή
- Συνδεδεμένος υπολογιστής με τον αναγνώστη για την ανάλυση των αποτελεσμάτων
- Αυτόματες μικροπιπέτες ενός και πολλών καναλιών
- Δοχείο 1 λίτρου (για ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης)
- Χειροκίνητη ή αυτόματη διάτρηση για την κοπή δίσκων διηθητικού χαρτιού με διάμετρο 3 mm
- Δύο λίτρα αποσταγμένο νερό

Εξοπλισμός μιας χρήσης:

- Πλάκα στρογγυλού πυθμένα 96 πηγαδιών (για έκλυση κηλίδων αίματος)
- Συμβουλές για μικροπιπέτες
- Πλαστικές πιπέτες 10 mL
- Τέσσερα δοχεία αντιδραστηρίων σχολιασμού μίας χρήσης (ένα ανά αντιδραστήριο): PBS, βιοτινυλιωμένα αντισώματα, στρεπταβιδίνη-ευρώπιο και διάλυμα ανάπτυξης
- Λεκίδες αίματος νεογέννητου σε βαθμονομημένες, εγκεκριμένες από την αρχή κάρτες διαλογής

ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΚΙΤ

Κάθε κιτ περιέχει αντιδραστήρια για 96 δοκιμασίες. Η ημερομηνία λήξης αναγράφεται σε όλες τις ετικέτες του κιτ.

Η πλάκα μικροτίτλου παρουσιάζεται σε αφαιρούμενες λωρίδες, επιτρέποντας την προσαρμογή της ανάλυσης στον αριθμό των δειγμάτων που πρόκειται να εξεταστούν. Ωστόσο, κάθε ανάλυση πρέπει να περιλαμβάνει ένα εύρος αναφοράς και εσωτερικούς ελέγχους.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΠΡΙΝ ΤΟ ΑΝΟΙΓΜΑ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗ	ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΞΕΝΑΡΞΗ
Πλάκα μικροτιτλοδότησης (96 φρεάτια σε οριζόντιες λωρίδες των 8 x 12 φρεατίων)	Αποθηκεύστε τα στο σκοτάδι στην αρχική τους συσκευασία μεταξύ +2°C και +8°C μέχρι την ημερομηνία λήξης.	Επικαλυμμένο με αντισώματα κατά του ΠΑΠ. Έτοιμο για χρήση.	Φυλάσσεται σε θερμοκρασία +2°C έως +8°C, στα παρεχόμενα αποξηραμένα σακουλάκια, για έως και 30 ημέρες.
Εύρος αναφοράς PAP		Οι κηλίδες αίματος σε βαθμονομημένο διηθητικό χαρτί πρέπει να διατηρηθούν και να εκπλυθούν σε 150 μL PBS κατά τη διάρκεια της νύχτας (16 ώρες) στους +2°C έως +8°C.	
Εσωτερικοί έλεγχοι			
Βιοτινυλιωμένα αντισώματα αντι-PAP	Σταθερό μεταξύ +2°C και +8°C μέχρι την ημερομηνία λήξης.	Το λυοφιλοποιημένο προϊόν πρέπει να λαμβάνεται απαλά σε 11 mL αποσταγμένου νερού, απευθείας στο φιαλίδιο.	Φυλάσσεται στους -20°C για έως και 30 ημέρες.
Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης συζεύγματος		Φιάλη 15 mL. Χρησιμοποιήστε το για να αραιώσετε το σύζευγμα στρεπταβιδίνης-ευρωπίου 1:1000.	Φυλάσσεται μεταξύ +2°C και +8°C για μέγιστο διάστημα 30 ημερών.
Σύζευξη στρεπταβιδίνης-ευρωπίου		Αραιώστε 1:1000 σε ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης συζεύγματος. Προετοιμάστε τον απαραίτητο όγκο αυθόρμητα.	Μην αποθηκεύετε την αραιώση 1:1000 σε ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης.
Διάλυμα ανάπτυξης φθορισμού (λύση αποκάλυψης)		2 φιαλίδια των 11 mL το καθένα. Έτοιμο για χρήση.	Φυλάσσεται μεταξύ +2°C και +8°C για μέγιστο διάστημα 30 ημερών.
Ταμπλέτα PBS		Διαλύεται σε 1 L απεσταγμένου νερού. Αφήστε στην άκρη 20 ml για την έκλυση των κηλίδων αίματος.	Αποθηκεύστε το παρασκευασμένο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης στους -20°C για έως και 30 ημέρες.
Διάλυμα Tween 20		Προσθέστε στα υπόλοιπα 980 mL PBS για να φτιάξετε το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης.	

Υπό αυτές τις συνθήκες, το σετ μπορεί να χρησιμοποιηθεί εντός 30 ημερών από το άνοιγμα.

Όπως παρέχεται από την Dynabio S.A., το κιτ ανάλυσης MucPAP-F δεν είναι αυτοματοποιημένο.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΟΥ ΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΑΤΙΚΟΥ
Πλάκα μικροτιτλοδότησης (96 φρεάτια σε οριζόντιες λωρίδες των 8 x 12 φρεατίων)	Φρεάτια επικαλυμμένα με μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού που κατευθύνονται ειδικά κατά του PAP	4 µg/mL
Εύρος αναφοράς PAP	Χαρτί φίλτρου που περιέχει 2 σετ από 6 αποξηραμένα σημεία αίματος συμπληρωμένα με PAP	0 µg PAP/L αίματος 0,39 µg PAP/L αίματος 0,78 µg PAP/L αίματος 1,56 µg PAP/L αίματος 3,13 µg PAP/L αίματος 6,25 µg PAP/L αίματος
Εσωτερικοί έλεγχοι	Χαρτί φίλτρου που περιέχει 2 σετ 3 αποξηραμένων κηλίδων αίματος συμπληρωμένα με PAP	Low: 1 µg PAP/L αίματος Medium: 2 µg PAP/L αίματος High: 3 µg PAP/L αίματος
Βιοτινυλιωμένα αντισώματα αντι-PAP	Μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού ειδικά για το PAP, συνδεδεμένο με βιοτίνη, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων που περιέχουν προστατευτικούς παράγοντες	0,25 µg/mL
Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης συζεύγματος	Αλατούχο διάλυμα με βάση ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl που περιέχει πρωτεΐνες βοοειδών, απορρυπαντικό και αντιβακτηριακό παράγοντα	/
Σύζευξη στρεπταβιδίνης-ευροπίου	Σύμπλοκο Europium-στρεπταβιδίνης, σε ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα Tris-HCl που περιέχει προστατευτικούς και αντιβακτηριακούς παράγοντες	0,1 mg/mL
Διάλυμα ανάπτυξης φθορισμού	Διάλυμα που περιέχει οξικό οξύ, απορρυπαντικό και χηλικούς παράγοντες	2-NTA 15 µM TOPO 50 µM
Ταμπλέτα PBS	Αλάτι φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα	/
Tween 20	Συμπυκνωμένο διάλυμα απορρυπαντικού	10%

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Τα δείγματα αίματος πρέπει να λαμβάνονται με τσίμπημα στη φτέρνα και να συλλέγονται απευθείας σε εγκεκριμένο διηθητικό χαρτί (μέθοδος αναφοράς). Εάν το δείγμα δεν μπορεί να εφαρμοστεί απευθείας στο διηθητικό χαρτί, μην χρησιμοποιείτε αίμα που έχει συλλεχθεί παρουσία αντιπηκτικών αντιδραστηρίων που σχηματίζουν χηλική ένωση του ευρώπιου (EDTA, κιτρικό άλας), τα οποία θα επηρεάσουν τα αποτελέσματα της ανάλυσης.

Η μέθοδος και η πλήρης συσκευή δειγματοληψίας πρέπει να συμμορφώνονται με τους κανονισμούς.

Συνιστάται να συμβουλευέστε τους κανονισμούς σχετικά με τον τύπο του απαιτούμενου δείγματος και την κατάλληλη περίοδο για τη συλλογή δείγματος σύμφωνα με το τρέχον πρόγραμμα ελέγχου νεογνών. Το τελευταίο καθορίζει επίσης το χρονικό πλαίσιο για την εξέταση PAP μετά τη συλλογή του δείγματος.

Τα αποτελέσματα μιας ανάλυσης που βασίζεται σε αποξηραμένα δείγματα αίματος εξαρτώνται άμεσα από τη φροντίδα που λαμβάνεται κατά τη συλλογή, το χειρισμό, τη μεταφορά και την αποθήκευση των δειγμάτων. Η τεκμηρίωση (6) περιγράφει με ακρίβεια τις μεθόδους συλλογής δειγμάτων και τις αποδεκτές τεχνικές για την εφαρμογή σταγόνων ή υποπολλαπλασίων αίματος σε τυποποιημένο διηθητικό χαρτί. Παρέχει επίσης οδηγίες σχετικά με τον κατάλληλο χειρισμό, τη μεταφορά και την αποθήκευση των δειγμάτων, ώστε να διασφαλίζονται ποιοτικά αποτελέσματα στον έλεγχο νεογνών.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Αυτό το κιτ πρέπει να χρησιμοποιείται για *in vitro* διαγνωστικούς σκοπούς μόνο από ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό με κατάλληλο προστατευτικό εξοπλισμό.

Οι αποξηραμένες κηλίδες αίματος ασθενούς, εύρους και ελέγχου και τα βιοτινυλιωμένα αντισώματα περιέχουν στοιχεία αίματος ανθρώπινης ή ζωικής προέλευσης: θα πρέπει να θεωρούνται δυνητικά μολυσματικά και να χειρίζονται με τις απαραίτητες προφυλάξεις για την προστασία του χρήστη.

Ανατρέξτε στο δελτίο δεδομένων ασφαλείας της συσκευής για τη διάθεση. Τα απόβλητα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους κανονισμούς που ισχύουν στη χώρα χρήσης.

Μην πιπετάρετε στο στόμα.

Μην τρώτε, μην πίνετε και μην καπνίζετε κατά τη διάρκεια του χειρισμού.

Τα ακόλουθα αντιδραστήρια μπορεί να είναι τοξικά ή ερεθιστικά: PBS, ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης, σύζευξη στρεπταβιδίνης-ευροπίου και διάλυμα ανάπτυξης φθορισμού. Αποφύγετε την επαφή με το δέρμα, τα μάτια και τους βλεννογόνους. Σε περίπτωση τυχαίας επαφής, ξεπλύνετε καλά με νερό.

Κάθε σοβαρό περιστατικό σε σχέση με το προϊόν πρέπει να κοινοποιείται στον κατασκευαστή και στην αρμόδια αρχή του κράτους μέλους στο οποίο είναι εγκατεστημένος ο χρήστης ή/και ο ασθενής.

ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ

Καθορίστε μια διάταξη πλάκας που πρέπει να ακολουθηθεί προσεκτικά, καθορίζοντας τη σειρά εναπόθεσης στα φρεάτια του εύρους, του τυφλού, του ελέγχου και των δειγμάτων νεογνών, ώστε να αποφευχθεί η αντιστροφή των γροθιών.

Αποφύγετε τη βιολογική ή χημική μόλυνση των δειγμάτων.

Μην χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια που έχουν λήξει.

Μην αναμειγνύετε αντιδραστήρια από διαφορετικές παρτίδες.

Εξισορροπήστε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου (+19°C έως +22°C) και ανακινήστε τα πριν από τη χρήση.

Αποφύγετε τη διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ διαφορετικών αντιδραστηρίων: χρησιμοποιήστε διαφορετικό δοχείο για κάθε αντιδραστήριο (τα δοχεία δεν παρέχονται).

Τηρήστε αυστηρά το χρόνο επώασης που αναφέρεται για κάθε βήμα.

Οι πλύσεις πρέπει να γίνονται προσεκτικά για να αποφεύγεται η αύξηση του θορύβου υποβάθρου.

Μην αφήνετε ποτέ την πλάκα να στεγνώσει, καθώς αυτό θα επηρεάσει την ποιότητα των αποτελεσμάτων.

Το λυοφιλοποιημένο βιοτινυλιωμένο αντίσωμα πρέπει να προετοιμάζεται τουλάχιστον 10 λεπτά νωρίτερα, ώστε να διασφαλίζεται η πλήρης διάλυση και η ομοιογένεια του αντιδραστηρίου.

Το διάλυμα ανάπτυξης φθορισμού είναι θερμοευαίσθητο αντιδραστήριο και πρέπει να αποθηκεύεται μεταξύ +2°C και +8°C.

Σε περίπτωση βλάβης του κιτ κατά τη μεταφορά (χυμένα ή/και σπασμένα φιαλίδια, ξαναφουσκωμένες σακούλες αλουμινίου), επικοινωνήστε με την Dynabio S.A. μέσω ηλεκτρονικού ταχυδρομείου στη διεύθυνση info@dynabio.eu ή μέσω τηλεφώνου στο +33 (0)4 86 94 85 04.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΩΝ

Την ημέρα πριν από τη δοσολογία :

Διαλύστε το παρεχόμενο δισκίο PBS σε 1 L απεσταγμένου νερού. Μετά την πλήρη ομογενοποίηση, χρησιμοποιήστε 20 mL για την έκλυση των κηλίδων αίματος: τα υπόλοιπα 980 mL διατηρούνται στους +2°C έως +8°C μέχρι την επόμενη ημέρα, την ημέρα της ανάλυσης, για την προετοιμασία του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης.

Δείγματα προς δοκιμή : Κόψτε ένα σφαιρίδιο διαμέτρου 3 mm από το χαρτόνι σε μια περιοχή όπου το αίμα έχει διαπεράσει πλήρως το χαρτόνι, χωρίς υπερφόρτωση ή διπλή εναπόθεση. Τοποθετήστε το μαξιλάρι σε ένα φρεάτιο μιας πλάκας στρογγυλού πυθμένα 96 φρεατίων (δεν περιλαμβάνεται στο κιτ). Για να λάβετε μια διπλή ανάλυση, χτυπήστε σε 2 διαφορετικά σημεία στο ίδιο σημείο αίματος. Προσθέστε 150 μL ρυθμιστικού διαλύματος PBS σε κάθε φρεάτιο. Εκλούστε τουλάχιστον 16 ώρες (κατά τη διάρκεια της νύχτας) στους $+2^{\circ}\text{C}$ έως $+8^{\circ}\text{C}$.

Εύρος αναφοράς: Όπως και τα δείγματα που πρόκειται να δοσολογηθούν, κόψτε ένα τετράγωνο διαμέτρου 3 mm από τις κάρτες εύρους, υποχρεωτικά στην περιφέρεια του σημείου. Τα έξι σημεία του εύρους πρέπει να διατηρηθούν εις διπλούν. Τοποθετήστε κάθε μαξιλαράκι σε ένα φρεάτιο μιας πλάκας στρογγυλού πυθμένα 96 φρεατίων (δεν περιλαμβάνεται στο κιτ). Προσθέστε 150 μL ρυθμιστικού διαλύματος PBS ανά φρεάτιο. Εκλούστε για τουλάχιστον 16 ώρες (κατά τη διάρκεια της νύχτας) στους $+2^{\circ}\text{C}$ έως $+8^{\circ}\text{C}$. Λαμβάνονται έξι σημεία εύρους: 6,25 / 3,13 / 1,56 / 0,78 / 0,39 και 0 $\mu\text{g/L}$.

Εσωτερικοί έλεγχοι: Όπως και το εύρος, οι τρεις εσωτερικοί έλεγχοι πρέπει να διατηρηθούν εις διπλούν από το βαθμονομημένο χαρτόνι που παρέχεται στο κιτ, υποχρεωτικά στην περιφέρεια της χρώσης (σφαιρίδια διαμέτρου 3 mm). Τοποθετήστε κάθε μαξιλαράκι σε ένα φρεάτιο μιας πλάκας στρογγυλού πυθμένα 96 φρεατίων (δεν περιλαμβάνεται στο κιτ). Προσθέστε 150 μL ρυθμιστικού διαλύματος PBS ανά φρεάτιο. Εκλούστε για τουλάχιστον 16 ώρες (κατά τη διάρκεια της νύχτας) στους $+2^{\circ}\text{C}$ έως $+8^{\circ}\text{C}$. Η συγκέντρωση του PAP στους τρεις ελέγχους είναι 1 $\mu\text{g/L}$ (Low Control), 2 $\mu\text{g/L}$ (Medium Control) και 3 $\mu\text{g/L}$ (High Control) αντίστοιχα.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΑΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Την ημέρα της ανάλυσης: Μετά από αυτή την ολονύκτια επώαση, όλα τα εκχυλίσματα πρέπει να ομογενοποιηθούν με αναρρόφηση και εκτόπιση, όταν λαμβάνονται τα 100 μL προς ανάλυση. Τα άκρα των μικροπιπετών πρέπει να αλλάζουν μεταξύ κάθε κατάθεσης ομογενοποιημένων δειγμάτων αίματος εύρους, ελέγχου ή νεογνικού αίματος.

Δοσομετρική πλάκα: Η πλάκα, υπό κενό, πρέπει να ισορροπήσει σε θερμοκρασία δωματίου πριν την αφαιρέσετε από τη συσκευασία αλουμινίου. Μετά το άνοιγμα, η πλάκα πρέπει να αναγνωρίζεται από τον χρήστη, ώστε να μην συγχέεται με άλλη πλάκα που υποβλήθηκε σε επεξεργασία την ίδια ημέρα. Όλες οι λωρίδες κάθε πλάκας πρέπει επίσης να αναγνωρίζονται (Α έως Η) για να αποφεύγεται η εναλλαγή τους σε περίπτωση που αποκολληθούν από το πλαίσιο τους κατά τη διάρκεια των βημάτων πλύσης.

Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (PBS-0,1% Tween): Στο υπόλοιπο PBS που διαλύθηκε την προηγούμενη ημέρα (980 mL), προσθέστε το περιεχόμενο της φιάλης του Tween 20 (10%) που παρέχεται και αναμείξτε καλά.

Βιοτινυλιωμένα αντισώματα: Το λυοφιλοποιημένο προϊόν λαμβάνεται απαλά σε 11 mL απεσταγμένου νερού απευθείας στο φιαλίδιο. Είναι έτοιμο για χρήση μετά από πλήρη διάλυση και ομογενοποίηση.

Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης συζεύγματος: Μετά την ομογενοποίηση, το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται για την προετοιμασία της αραιώσης 1:1000 του συζεύγματος στρεπταβιδίνης-ευροπίου (βλέπε κατωτέρω).

Σύζευξη στρεπταβιδίνης-ευροπίου (0,1 mg/mL): αραιώστε αυτή τη σύζευξη 1:1000 σε ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης σε συγκέντρωση 0,1 $\mu\text{g/mL}$. Ο όγκος του αραιωμένου συζεύγματος που πρέπει να παρασκευαστεί εξαρτάται από τον αριθμό των φρεατίων που χρησιμοποιούνται την ημέρα. Αυτή η αραιώση πρέπει να προετοιμάζεται εκτάκτως κατά τη διάρκεια της επώασης του βιοτινυλιωμένου αντισώματος στα φρεάτια.

Διάλυμα ανάπτυξης: έτοιμο προς χρήση μετά την ομογενοποίηση.

ΤΗΝ ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΣΟΛΟΓΙΑΣ

Ένα εύρος PAP λαμβάνεται μετά την έκλυση σε PBS των έξι πρότυπων συγκεντρώσεων που παρέχονται στο κιτ. Περιλαμβάνει διαλύματα συγκέντρωσης 6,25 / 3,13 / 1,56 / 0,78 / 0,39 και 0 $\mu\text{g/L}$, που λαμβάνονται εις διπλούν.

Κάθε σημείο εύρους, που εκλούεται εις διπλούν, τοποθετείται, μετά από ομογενοποίηση, στην πλάκα ανάλυσης (100 μL /πηγάδι). Οι μύτες των μικροπιπετών πρέπει να αλλάζουν μεταξύ κάθε σημείου ομογενοποιημένου εύρους. Τα δύο φρεάτια που λαμβάνουν 100 μL της κουκκίδας 0 $\mu\text{g/L}$ θα χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση του υποβάθρου της ανάλυσης.

Τα εκχυλίσματα των νεογνικών κηλίδων και τα εκχυλίσματα των εσωτερικών ελέγχων προστίθενται εις διπλούν στην πλάκα ανάλυσης (100 μL /πηγάδι) μετά την ομογενοποίηση. Οι μύτες των μικροπιπετών πρέπει να αλλάζουν μεταξύ κάθε ομογενοποιημένου δείγματος ελέγχου ή νεογνού.

Οι αποθέσεις αυτές επωάζονται επί 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ($+19^{\circ}\text{C}$ έως $+22^{\circ}\text{C}$), υπό ανάδευση (τροχιακή κίνηση στις 300 στροφές ανά λεπτό), ενώ προηγουμένως η πλάκα καλύπτεται με κόλλα.

Στη συνέχεια, τα φρεάτια πλένονται 5 φορές ως εξής, χρησιμοποιώντας το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 0,1% PBS/Tween που έχει παρασκευαστεί προηγουμένως:

- Αναρροφήστε το περιεχόμενο των φρεατίων,
- Γεμίστε κάθε φρεάτιο με ~300 μL ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης.
- Επαναλάβετε αυτά τα δύο πρώτα βήματα 4 φορές,
- Μετά την τελευταία πλύση, απομακρύνετε το υπόλοιπο υγρό αναποδογυρίζοντας δυνατά την πλάκα (σε νεροχύτη ή δοχείο υγρών αποβλήτων) και στη συνέχεια χτυπώντας την σε μια χαρτοπετσέτα.

Σημείωση: συνιστάται η χρήση αυτόματου ή ημιαυτόματου πλυντηρίου.

Το διάλυμα βιοτινυλιωμένου αντισώματος εφαρμόζεται αμέσως (100 μL /πηγάδι) και επωάζεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση (τροχιακή κίνηση στις 300 στροφές ανά λεπτό) και η πλάκα καλύπτεται με κόλλα.

Η πλάκα πλένεται 5 φορές όπως περιγράφεται ανωτέρω.

Προστίθεται αμέσως διάλυμα σύζευξης στρεπταβιδίνης-ευρωπαϊού αραιωμένο σε 0,1 $\mu\text{g/mL}$ σε ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (100 μL /πηγάδι) και επωάζεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση (περιστροφικό όργανο στις 300 στροφές ανά λεπτό) με την πλάκα καλυμμένη με κόλλα.

Η πλάκα πλένεται 5 φορές όπως περιγράφεται ανωτέρω.

Στη συνέχεια, προστίθεται το διάλυμα ανάπτυξης (200 μL /πηγή). Μην καλύπτετε την πλάκα με την κόλλα, καθώς αυτό μπορεί να σβήσει το σήμα.

Μετά από επώαση τουλάχιστον 30 λεπτών υπό ανάδευση (περιστροφικό όργανο στις 300 στροφές ανά λεπτό), ο φθορισμός διαβάζεται με τη χρήση φασματοφθοριόμετρου, με διέγερση σε μήκος κύματος 337 nm και μέτρηση της εκπομπής στα 620 nm. Ένα σταθερό και ακριβές σήμα μπορεί να εξασφαλιστεί μόνο εάν η πλάκα διαβαστεί τουλάχιστον 30 λεπτά μετά την προσθήκη του διαλύματος ανάπτυξης.

Σημείωση: ο ελάχιστος χρόνος επώασης του διαλύματος αποκάλυψης που προτείνεται σε αυτό το πρωτόκολλο καθορίστηκε σε συσκευή ανάγνωσης Fluostar Omega (BMG Labtech): βλέπε λεπτομέρειες για τη διαμόρφωση αυτής της συσκευής στο κεφάλαιο "ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ".

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Βαθμονόμηση

Πρέπει να χρησιμοποιείται μια πρότυπη καμπύλη για κάθε δοκιμή που εκτελείται. Εάν η ανάλυση της ημέρας αποτελείται από πολλές πλάκες, το εύρος πρέπει να τοποθετείται σε κάθε πλάκα.

Για να προκύψει αυτή η καμπύλη, το υπόβαθρο της ανάλυσης πρέπει πρώτα να υπολογιστεί ως ο μέσος όρος των τιμών που λαμβάνονται για το τυφλό (σημείο 0 $\mu\text{g/L}$) και στη συνέχεια να αφαιρεθεί από τα ακατέργαστα αποτελέσματα που λαμβάνονται για όλα τα σημεία του εύρους.

Αυτό το υπόβαθρο πρέπει επίσης να αφαιρεθεί από το σήμα κάθε επανάλυσης ελέγχου και δείγματος πριν από τη μέση τιμή των δύο επαναλήψεων.

Παράδειγμα αποτελεσμάτων που λαμβάνονται για ένα εύρος αναφοράς με μέσο υπόβαθρο 4125 μετρήσεων (ενδεικτικά):

PAP ($\mu\text{g/L}$)	Φθορισμός				
	Απάντηση 1	Απάντηση 2	Απάντηση 1 - μέσος θόρυβος υποβάθρου	Απάντηση 2 - μέσος θόρυβος υποβάθρου	Μέσος όρος
0	4200	4050			
0,39	10617	11169	6492	7044	6768
0,78	20409	16023	16284	11898	14091
1,56	33079	32551	28954	28426	28690
3,13	58947	63764	54822	59639	57231
6,25	118902	116993	114777	112868	113823

Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάζεται σύμφωνα με τη συνάρτηση $[\text{PAP}] = f(\text{μέση ένταση φθορισμού})$, με αντιστοίχιση του μέσου φθορισμού κάθε σημείου του εύρους με τη θεωρητική του συγκέντρωση και εφαρμογή γραμμικής παλινδρόμησης. Συνιστάται η χρήση ενός προγράμματος υπολογιστή για τον υπολογισμό αυτής της συνάρτησης από τις τιμές του εύρους αναφοράς. Η συγκέντρωση PAP στα εκχυλίσματα των κηλίδων (ελέγχου και δειγμάτων) υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την εξίσωση της καμπύλης που κατασκευάστηκε με τον τρόπο αυτό.

Ποιοτικός έλεγχος

Συνιστάται η χρήση εσωτερικών ελέγχων για τη διασφάλιση της εγκυρότητας των αποτελεσμάτων. Οι έλεγχοι πρέπει να αντιμετωπίζονται με τον ίδιο τρόπο όπως τα δείγματα. Στο κιτ παρέχονται τρεις έλεγχοι που αντιστοιχούν σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις PAP (low, medium, high). Αυτοί οι έλεγχοι πρέπει να περιλαμβάνονται σε κάθε δοκιμασία: εάν η ημερήσια δοκιμασία αποτελείται από πολλές πλάκες, οι έλεγχοι πρέπει να τοποθετούνται σε κάθε πλάκα. Συνιστάται οι έλεγχοι να μην αποκλίνουν περισσότερο από $\pm 20\%$ από τη θεωρητική τους συγκέντρωση:

Έλεγχος - Θεωρητική συγκέντρωση	Χαμηλό όριο	Υψηλό όριο
Low - 1 $\mu\text{g/L}$	0,8 $\mu\text{g/L}$	1,2 $\mu\text{g/L}$
Medium - 2 $\mu\text{g/L}$	1,6 $\mu\text{g/L}$	2,4 $\mu\text{g/L}$
High - 3 $\mu\text{g/L}$	2,4 $\mu\text{g/L}$	3,6 $\mu\text{g/L}$

Τα αποτελέσματα του δείγματος πρέπει να επικυρώνονται μόνο εάν τα αποτελέσματα ελέγχου για τη συγκεκριμένη ανάλυση πληρούν τα κριτήρια αποδοχής.

Σε περίπτωση επαναλαμβανόμενων προβλημάτων ή μεταβολής της απόδοσης της ανάλυσης, επικοινωνήστε με την Dynabio S.A. μέσω ηλεκτρονικού ταχυδρομείου στη διεύθυνση info@dynabio.eu ή μέσω τηλεφώνου στο +33 (0)4 86 94 85 04.

Ανάλυση των αποτελεσμάτων των νεογνικών δειγμάτων

Υπολογισμός της συγκέντρωσης PAP στο αίμα των νεογνών: Εάν ακολουθείται αυστηρά το πρωτόκολλο που περιγράφεται ανωτέρω και τα δείγματα προέρχονται από βαθμονομημένα κουτιά διαλογής, διάτρητα με διάμετρο 3 mm, η συγκέντρωση PAP στο αίμα για κάθε νεογέννητο λαμβάνεται απευθείας με τη χρήση της εξίσωσης της καμπύλης εύρους $[\text{PAP}] = f(\text{μέση ένταση φθορισμού})$

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΔΟΣΟΛΟΓΙΑΣ

Οι πληροφορίες σχετικά με τη δοκιμασία PAP που λαμβάνονται με το κιτ MucopAP-F θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ως συμπλήρωμα άλλων δοκιμασιών και εξετάσεων (π.χ. δοκιμασία IRT) που πραγματοποιούνται στο πλαίσιο του ελέγχου κυστικής ίνωσης. Θα πρέπει να ερμηνεύεται υπό το πρίσμα άλλων διαθέσιμων κλινικών πληροφοριών.

Συνθήκες που μπορεί να οδηγήσουν σε μη φυσιολογικά αναλυτικά αποτελέσματα :

- η κάρτα εξέτασης δεν είναι ομοιόμορφα κορεσμένη με αίμα,
- το δείγμα κόπηκε πολύ κοντά στην άκρη της περιοχής δειγματοληψίας,
- το δείγμα κόπηκε στο κέντρο της κηλίδας αντί της περιφέρειας,
- το δείγμα συλλέχθηκε ή ξηράνθηκε εσφαλμένα,
- το δείγμα έχει εκτεθεί σε θερμότητα ή υγρασία,
- το χαρτόνι είναι μολυσμένο με περιττώματα.

Το δείγμα αίματος δεν πρέπει να περιέχει EDTA ή κιτρικό άλας που είναι χηλικοί παράγοντες του ευρώπιου.

Βλέπε επίσης τις ενότητες "Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις" και "Συστάσεις για τη χρήση".

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η αξιολόγηση της συγκέντρωσης PAP σε κηλίδες αίματος χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό ενός πληθυσμού νεογνών υψηλού κινδύνου κυστικής ίνωσης. Οι τρέχουσες στρατηγικές περιλαμβάνουν γενικά τρία βήματα. Στο πρώτο βήμα, το ανοσοαντιδραστικό θρυψινογόνο (IRT) προσδιορίζεται σε όλα τα νεογέννητα. Στη δεύτερη, η PAP μετράται σε νεογνά με υψηλή TIR. Στα νεογνά με υψηλό TIR και PAP, ένα τρίτο βήμα συνίσταται είτε σε μια διαγνωστική εξέταση, τη δοκιμασία ιδρώτα, είτε στην αναζήτηση μεταλλάξεων στο γονίδιο CFTR, ενδεχομένως ακολουθούμενη από μια δοκιμασία ιδρώτα στα νεογνά με αυτές τις μεταλλάξεις.

Η Haute Autorité de Santé διενήργησε εξαντλητική επισκόπηση των επιδόσεων των στρατηγικών που χρησιμοποιούνται σήμερα και δημοσιεύθηκε το 2015. Διατίθεται υπό τον τίτλο "*Place de la stratégie couplant les assages de la TIR et de la PAP dans le dépistage systématique de la mucoviscidose en France*" στην ακόλουθη διεύθυνση http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1739994/fr/.

Συνιστάται να γίνεται αναφορά στην ανάλυση αυτή πριν από την εφαρμογή ενός νεογνικού ελέγχου για κυστική ίνωση που περιλαμβάνει τεστ PAP.

ΑΠΟΛΟΣΗ

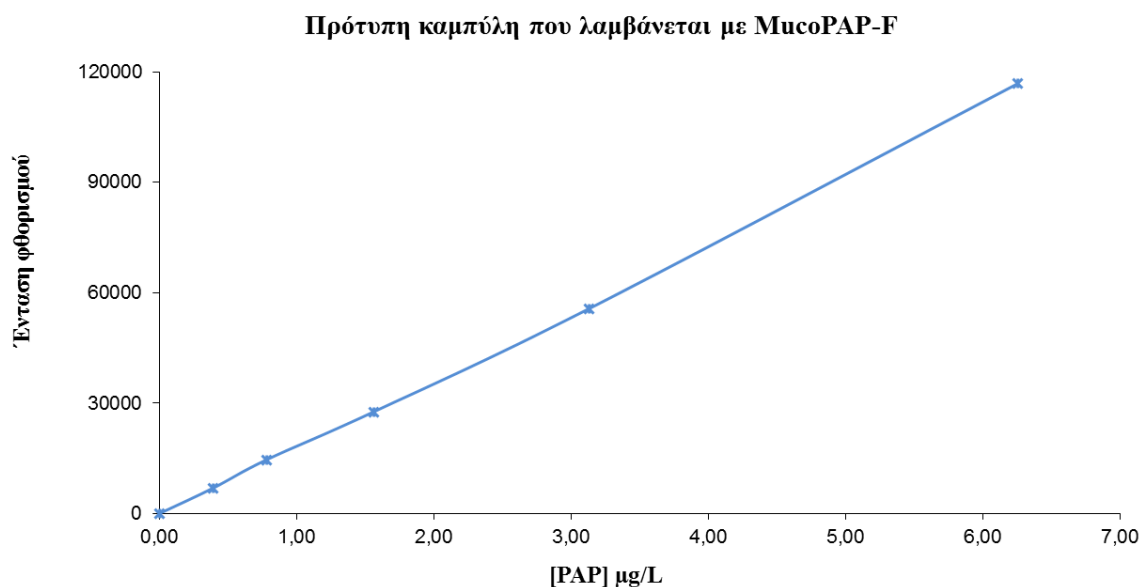
Στα νεογνά με αυξημένη τιμή TIR ($> 50 \mu\text{g/L}$), όλα τα παιδιά με κυστική ίνωση έχουν PAP $> 1,75 \mu\text{g/L}$ (εκτός από τις απογοητευτικές μορφές και τα μωρά με ειλεό του μηκωνίου). Τα προσβεβλημένα νεογνά αντιπροσωπεύουν περίπου το 25% των νεογνών με αυξημένη τιμή IRT και PAP $> 1,75 \mu\text{g/L}$. Τα μη προσβεβλημένα νεογνά σε αυτή την ομάδα περιλαμβάνουν πρόωρα βρέφη, βρέφη με σύνδρομο Down και βρέφη με σοβαρές γαστρεντερικές λοιμώξεις (4, 7).

ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

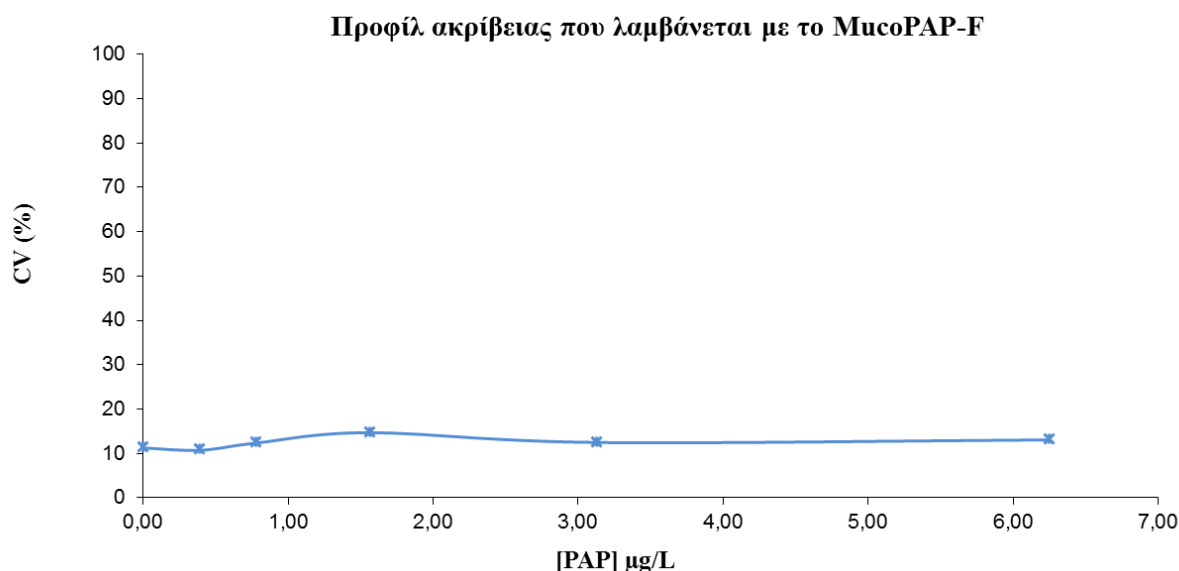
Όλα τα δεδομένα που παρουσιάζονται παρακάτω ελήφθησαν με τη συσκευή Fluostar Omega της BMG Labtech, τα χαρακτηριστικά της οποίας είναι τα εξής

- Τρόπος ανάγνωσης: TRF (Φθορισμός με επαναφορά χρόνου)
- Μπορεί να είναι υπερευαίσθητος,
- Φίλτρο διέγερσης: 337 nm/ Φίλτρο εκπομπής: 620 nm
- Ολοκλήρωση: 60 μs
- Διάρκεια: 400 μs
- Χρόνος παύσης πριν από την έναρξη της αναπαραγωγής: 0,2 δευτερόλεπτα
- Αριθμός αναλαμπών ανά φρεάτιο: 200

Πρότυπη καμπύλη: Μια τυπική πρότυπη καμπύλη για τη συσκευή MucosPAP-F παρουσιάζεται στο παρακάτω γράφημα. Ορίστηκε με τη χρήση τεσσάρων διαφορετικών παρτίδων και τη διάτρηση των έξι σημείων εύρους εννέα φορές σε κάθε παρτίδα.



Προφίλ ακρίβειας: Το προφίλ ακρίβειας της συσκευής MucosPAP-F προσδιορίστηκε με τη χρήση τεσσάρων διαφορετικών παρτίδων και τη διάτρηση των έξι σημείων εύρους εννέα φορές σε κάθε παρτίδα. Παρουσιάζεται στο παρακάτω γράφημα.



Επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα: Η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγιμότητα της συσκευής MucopAP-F προσδιορίστηκε με τη χρήση πέντε διαφορετικών παρτίδων κιτ και με τη διάτρηση κάθε μίας από τις τρεις εσωτερικές μονάδες ελέγχου που παρέχονται σε κάθε κιτ έντεκα φορές. Η επαναληψιμότητα αντιπροσωπεύει τη διακύμανση εντός της παρτίδας ($n = 11$) και η αναπαραγωγιμότητα αντιπροσωπεύει τη διακύμανση μεταξύ των παρτίδων ($n = 5$).

Αναμενόμενη τιμή ελέγχου (µg/L)	Τιμή που λαμβάνεται (µg/L)	Επαναληψιμότητα (CV σε %)	Αναπαραγωγιμότητα (CV σε %)
1	0,990	11,5	13,9
2	2,100	9,8	9,7
3	3,150	8,0	10,2

Όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού: Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού της ανάλυσης MucopAP-F (εκφρασμένα ως μικρογραμμάρια PAP ανά λίτρο αίματος) είναι 0,24 µg/L και 0,32 µg/L αντίστοιχα, υποθέτοντας ότι :

- το όριο ανίχνευσης ορίζεται ως 3 τυπικές αποκλίσεις πάνω από τον μέσο όρο των μηδενικών τυπικών μετρήσεων
- Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού ορίζεται ως 10 τυπικές αποκλίσεις πάνω από το μέσο όρο των μηδενικών πρότυπων μετρήσεων.

Διασταυρούμενη αντίδραση: Δεν παρατηρήθηκε διασταυρούμενη αντίδραση στη δοκιμασία MucopAP-F με τις πρωτεΐνες IL2, IL6, IFN, TNF και *Escherichia coli*.

Επίδραση αγκίστρου: Δεν υπάρχει επίδραση αγκίστρου μέχρι τη συγκέντρωση PAP 1000 µg/L, εκφρασμένη σε μικρογραμμάρια PAP ανά λίτρο αίματος.

ΕΓΓΥΗΣΗ

Οποιαδήποτε αλλαγή ή τροποποίηση της συνιστώμενης από τον κατασκευαστή διαδικασίας μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα. Στην περίπτωση αυτή, η Dynabio S.A. αποποιείται κάθε ευθύνη, ρητή, σιωπηρή ή θεσπισμένη από το νόμο, συμπεριλαμβανομένης της ευθύνης που προκύπτει από την πώληση ή τη μεταφορά του προϊόντος για τη χρήση του. Στην περίπτωση αυτή, η Dynabio S.A. δεν ευθύνεται για οποιαδήποτε άμεση ή έμμεση ζημία προκύψει από αυτήν.

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Iovanna *et al.* C R Acad Sci III. 1994;7:561-4.
2. Sarles *et al.* Arch Dis Child 1999;80:F118-22.
3. Barthelme *et al.* Arch. Pediatr 2001;8:275-281.
4. Sarles *et al* J Pediatr 2005;147:302-305.
5. Sarles *et al.* J Cyst Fibros 2014;13:384-90.
6. Dried Blood Spot Specimen Collection for Newborn Screening - Approved Standards (reference NBS01-Ed7, 7th edition, 2021). Clinical and Laboratory Standards Institute.
7. Weidler *et al.* J. Κυστική ίνωση 2016;15:752-758.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΗΣ ΔΟΣΟΛΟΓΙΑΣ

Θυμηθείτε να προετοιμάσετε τα εκλούσματα των κηλίδων αίματος σε 150 μ L PBS/πηγή, την προηγούμενη ημέρα της ανάλυσης σε πλάκα στρογγυλού πυθμένα (δεν περιλαμβάνεται στο κιτ)

1. Φέρτε τις πλάκες ανάλυσης και έκλουσης σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Μετά την εξισορρόπηση σε θερμοκρασία δωματίου, αφαιρέστε την πλάκα ανάλυσης από τη θήκη της και προσθέστε τα εκχυλίσματα των κηλίδων εύρους, των τριών ελέγχων και των δειγμάτων (100 μ L/πηγή) μετά από ομογενοποίηση.
3. Επώση για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση (τροχιακή κίνηση στις 300 στροφές ανά λεπτό).
4. Ολοκληρώστε την προετοιμασία του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης (προσθέστε Tween στο PBS που παρασκευάστηκε την προηγούμενη ημέρα).
5. Στο τέλος της επώσης 3 ωρών, πραγματοποιήστε 5 πλύσεις με PBS/Tween, αδειάστε την πλάκα και στεγνώστε.
6. Διανείμετε το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα (100 μ L/πηγή).
7. Επώση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση (τροχιακή κίνηση στις 300 στροφές ανά λεπτό).
8. Πραγματοποιήστε 5 πλύσεις με PBS/Tween, αδειάστε την πλάκα, στεγνώστε.
9. Διανείμετε το σύζευγμα στρεπταβιδίνης-ευροπίου (100 μ L/πηγάδι).
10. Επώση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση (τροχιακή κίνηση στις 300 στροφές ανά λεπτό).
11. Πραγματοποιήστε 5 πλύσεις με PBS/Tween, αδειάστε την πλάκα, στεγνώστε.
12. Διανείμετε το διάλυμα ανάπτυξης (200 μ L/πηγή).
13. Επώση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση (τροχιακή κίνηση στις 300 στροφές ανά λεπτό).
14. Διαβάστε τον φθορισμό στα 620 nm μετά από διέγερση στα 337 nm.

ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ